



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141216  
(43) 공개일자 2017년12월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/705* (2006.01) *G01N 33/92* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 14/70596* (2013.01)  
*G01N 33/92* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032235
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월06일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/031109
- (87) 국제공개번호 WO 2016/179456  
국제공개일자 2016년11월10일
- (30) 우선권주장  
62/158,157 2015년05월07일 미국(US)

- (71) 출원인  
은코이퓨, 아이앤씨.  
미국, 메릴랜드20852, 록빌, 스위트 107, 109 및  
111, 파크론 드라이브 12111
- (72) 발명자  
리우, 양  
미국 워싱턴 D.C. 20002, 스트리트 NE, 502 E  
썩, 판  
미국 워싱턴 D.C. 20002, 스트리트 NE, 502 E
- (74) 대리인  
신관호

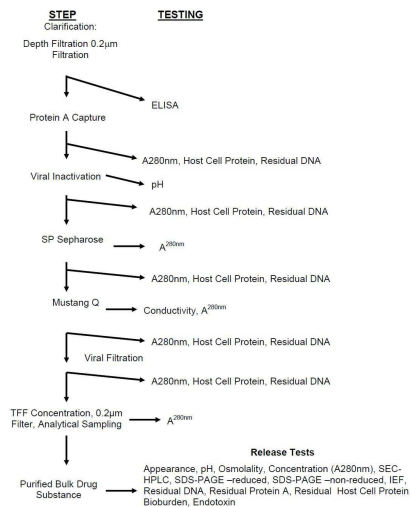
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 저밀도 지질단백질 콜레스테롤 레벨을 낮추기 위한 CD24의 용도

(57) 요약

본 발명은 저밀도 지질단백질 콜레스테롤 레벨을 낮추고, 죽상 동맥 경화증 예방 및 치료를 하며, 심혈관 질병의 위험을 감소시키기 위한 CD24 단백질의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*C07K 2319/30* (2013.01)

*G01N 2333/70596* (2013.01)

*G01N 2800/323* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

CD24 단백질을 필요로 하는 대상에게 CD24 단백질을 투여하여, 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤(LDL-C) 레벨을 낮추는 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,  
상기 대상이 높은 LDL-C인 방법.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서,  
상기 대상이 75mg/dL 이상의 LDL-C를 갖는 방법.

#### 청구항 4

제 2항에 있어서,  
상기 대상이 70mg/dL 또는 190mg/dL과 같거나 또는 높은 LDL-C를 갖는 방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,  
상기 대상이 다른 LDL-C-저하 약물로 미리 처리되어 있는 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,  
다른 LDL-C-저하 약물이 스타틴(statins)인 방법.

#### 청구항 7

제 5항에 있어서,  
다른 LDL-C-저하 약물이 PCSK9의 길항제인 방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,  
CD24 단백질은 성숙한 인간 CD24 또는 이의 변이체의 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,  
성숙한 인간 CD24는 SEQ ID NO: 1 및 2로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,  
CD24 단백질은 가용성인 방법.

**청구항 11**

제 1항에 있어서,  
CD24 단백질은 글리코실화된 방법.

**청구항 12**

제 8항에 있어서,  
CD24 단백질은 단백질 태그를 더 포함하며, 단백질 태그는 CD24 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 방법.

**청구항 13**

제 12항에 있어서,  
단백질 태그는 포유동물의 면역글로불린(Ig)의 일부를 포함하는 방법.

**청구항 14**

제 13항에 있어서,  
Ig 부분은 인간 Ig 단백질의 Fc 영역인 방법.

**청구항 15**

제 14항에 있어서,  
Fc 영역은 힌지 영역(hinge region) 및 인간 Ig 단백질의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하며, Ig는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

**청구항 16**

제 14항에 있어서,  
Fc 영역은 힌지 영역 및 IgM의 CH2, CH3 및 CH4 도메인을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제 15항에 있어서,  
CD24 단백질은 SEQ ID NO: 6, 11 또는 12의 서열을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제 1항에 있어서,  
CD24 단백질은 진핵 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산되는 방법.

**청구항 19**

제 18항에 있어서,  
발현 시스템은 중국 햄스터 난소 셀 라인(cell line)에 포함된 벡터 또는 복제 결손 레트로바이러스 벡터를 포함하는 방법.

**청구항 20**

제 19항에 있어서,  
복제 결손 레트로바이러스 벡터는 진핵 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는 방법.

**청구항 21**

CD24 단백질을 필요로 하는 대상에게 CD24 단백질을 투여하는 것을 포함하는 죽상 동맥 경화증

(atherosclerosis)을 치료 또는 예방하기 위한 방법.

**청구항 22**

CD24 단백질을 필요로 하는 대상에게 CD24 단백질을 투여하는 것을 포함하는 죽상 동맥 경화성 심혈관 질병의 위험을 낮추는 방법.

**청구항 23**

대상에게 CD24 단백질을 투여한 후 시점에 대상으로부터 얻은 혈액 샘플에서 LDL-C의 양과, 상기 시점 이전에 대상으로부터 얻은 혈액 샘플에서 LDL-C의 양을 비교하는 것을 포함하며, 시간 경과에 따른 LDL-C의 양의 감소는 CD24 단백질 활성의 증가를 나타내는, 대상에서 CD24 단백질의 활성을 모니터링하는 방법.

**청구항 24**

제 23항에 있어서,

CD24 단백질을 상기 대상에게 투여한 후 얻어진 샘플에서 LDL-C의 양에 따라, 후속으로 상기 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양이 조절되는 방법.

**청구항 25**

제 24항에 있어서,

후속 투여에서 CD24 단백질의 양은 상기 대상에서 CD24 단백질의 특정 활성 또는 농도 레벨을 유지하도록 조절되는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 저밀도 지질단백질 콜레스테롤 레벨을 낮추기 위한 CD24 단백질의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 저밀도 지질단백질(LDL) 콜레스테롤(LDL-C)의 높은 레벨을 포함하는, 이상지질혈증(Dyslipidemia)은 죽상 동맥 경화성 심혈관 질병(ASCVD: atherosclerotic cardiovascular disease)의 주요 위험 요인이며, 이는 전 세계적으로 주요 건강관리 비용 및 사망의 주된 원인이다. LDL-C와 ASCVD의 위험 사이의 연관성은 수년간의 유전적 및 생화학적 연구, 역학적 및 생태학적 관찰 연구, 및 시험관 내 및 동물 실험을 거쳐 확립되었다. LDL-C를 낮추는 것은 ASCVD 발현예(event)를 감소시키며, 이는 LDL-C가 관상 동맥 심장 질환(CHD) 및 ASCVD의 중심적, 인과 관계의 역할을 갖는다는 것을 증명한다. 따라서, 고정 복용량(fixed doses)의 콜레스테롤-저하 약물은 ASCVD 위험을 줄이기 위한 주요 접근법(primary approach)으로서 사용된다. 특히, 높은 LDL-C는 스타틴(STATIN)(3-히드록시-3-메틸글루타릴-코-엔자임-A 리덕타아제 억제제)으로 가장 빈번하게 처리된다. 스타틴은 베이스라인으로부터 50%까지 LDL-C를 낮추며, 그리고 ASCVD 위험을 15-37%까지 줄인다.

[0003] 그러나 나머지 60-80%의 ASCVD 위험이 남게 되어, 최적의 스타틴 치료하에서조차도 CHD를 갖는 환자의 약 20%에서 주요 혈관 발현예를 야기시킨다. 또한, 스타틴은 통증, 누름 통증, 결림, 경련, 쇠약, 피로, 근병증(myopathy), 및 횡문근융해(rhabdomyolysis)와 같은 근육 증상을 야기할 수 있다. 또한, 담즙산-결합 수지, 피브레이트(fibrate), 니아신(niacin), 및 에제티미브(ezetimibe)를 포함하는 비-스타틴제가 지질 프로파일(profile)을 상당히 개선시킨다 할지라도, 스타틴과 결합할 경우 심혈관 발현예에 대한 추가적인 위험 감소를 제공하지 않는다. 따라서, LDL-C 레벨을 낮출 수 있고 ASCVD의 위험을 감소시킬 수 있는 개선된 비-스타틴 약물에 대한 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

**본 발명의 요약**

[0004]

[0005] 본 발명은 CD24 단백질을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 대상에서 LDL-C 레벨을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, CD24 단백질을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여함으로써 대상에서 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis)을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 또한, CD24 단백질을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여함으로써, 죽상 동맥 경화성 심혈관 질병일 수 있는, 심혈관 질병의 위험을 낮추기 위한 방법이 제공된다. 대상은 LDL-C가 70, 75, 또는 190mg/dL과 같거나 또는 높은 LDL-C를 가질 수 있다. 대상은, 스타틴 또는 PCSK9의 길항제일 수도 있는, 다른 LDL-C-저하 약물에 의해 이전에 치료받았을 수도 있다.

[0006]

CD24 단백질은 성숙한 인간 CD24 또는 이의 변이체(variant)의 서열을 포함할 수 있다. 성숙한 인간 CD24는 SEQ ID NO: 1 또는 2의 서열을 포함할 수 있다. CD24 단백질은 인간 CD24의 세포외 도메인 중 임의 또는 전부를 포함할 수 있다. CD24 단백질은 신호 서열(signal sequence)을 포함할 수 있는데, 그것은 단백질을 발현하는 세포로부터 분비를 가능하게 할 수 있다. 신호 펩타이드 서열은 인간 CD24의 신호 펩타이드를 포함할 수 있는데, 그것은 SEQ ID NO:4를 가질 수 있거나, 또는 다른 막경위 또는 분비 단백질에서 발견되는 것일 수 있고, 또는 본 기술 분야에 알려진 기존의 신호 펩타이드로부터 변형된 것일 수 있다. CD24 단백질은 가용성일 수 있고, 글리코실화될 수 있다. CD24 단백질은 진핵 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산될 수 있는데, 그것은 중국 햄스터 난소 셀 라인(Chinese Hamster Ovary cell line) 또는 복제 결손 레트로바이러스(replication-defective retroviral) 벡터에 포함된 벡터를 포함할 수 있다. 복제 결손 레트로바이러스 벡터는 진핵 세포의 게놈에 안정적으로 통합될 수 있다.

[0007]

CD24 단백질은 단백질 태그를 포함할 수 있는데, 그것은 CD24 단백질의 N-또는 C-말단에 융합될 수 있다. CD24 단백질은, 인간일 수 있는, 포유동물 면역글로불린(Ig)의 일부를 포함할 수 있다. Ig 단백질의 일부는 Fc 영역일 수 있다. Fc 영역은 힌지 영역(hinge region) 및 Ig 단백질의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있으며 Ig 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgA 일 수 있다. 또한, Fc 영역은 힌지 영역 및 IgM의 CH2, CH3, 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. CD24 단백질은 SEQ ID NO: 5, 6, 8, 9, 11, 또는 12의 서열을 포함할 수 있다.

[0008]

또한, 본 발명은 대상에서 CD24 단백질의 활성을 모니터링하는 방법을 제공한다. 이 방법은, CD24 단백질을 투여한 시점에 대상으로부터 얻은 혈액 샘플에서 LDL-C의 양과 상기 시점 이전에 대상으로부터 얻은 혈액 샘플에서 LDL-C의 양을 비교하는 것을 포함한다. 시간 경과에 따른 LDL-C의 양의 감소는 CD24 단백질 활성의 증가를 나타내는 것일 수 있다. 이 방법은 CD24 단백질을 대상에게 투여한 후 얻어진 혈액 샘플에서 LDL-C의 양을 측정하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 또한 상기 시점 전에 대상으로부터 얻은 혈액 샘플에서 LDL-C의 양을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 대상에게 후속으로 투여되는 CD24 단백질의 양은 CD24 단백질을 대상에게 투여한 후 얻은 샘플에서 LDL-C의 양에 따라 조절될 수 있다. 후속 투여에서 CD24 단백질의 양은 대상에서 CD24 단백질의 농도 레벨의 특정 활성을 유지하도록 조절될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0009]

도 1A는 CD24Fc(또한, 본 명세서에서 CD24Ig로 지칭됨)(SEQ ID NO: 5), 전체 길이 CD24 융합 단백질의 아미노산 조성을 나타낸다. 밑줄 친 26개 아미노산은 CD24의 신호 펩타이드(SEQ ID NO: 4)이며, 그것은 단백질을 발현하는 세포로부터 분비하는 동안 절단됨에 따라 단백질(SEQ ID NO: 6)의 처리된 버전으로부터 없어진다(missing). 서열의 굵은 부분은 융합 단백질(SEQ ID NO: 2)에 사용된 성숙한 CD24 단백질의 세포외 도메인이다. 대개는 성숙한 CD24 단백질에 존재하는 최종 아미노산(A 또는 V)은 면역원성을 피하도록 구성으로부터 삭제되었다. 밑줄 치지 않고, 굵지 않은 문자는 IgG1 Fc의 서열이며, 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인(SEQ ID NO: 7)을 포함한다. 도 1B는 CD24<sup>V</sup>Fc의 서열(SEQ ID NO: 8)을 나타내며, 여기서 성숙한 인간 CD24 단백질(굵은 부분)은 SEQ ID NO: 1의 발린(valine) 다형성 변이체이다. 도 1C는 Cd24<sup>A</sup>FC(SEQ ID NO: 9)의 서열을 나타내며, 여기서 성숙한 인간 CD24 단백질(굵은 부분)이 SEQ ID NO: 1의 알라닌(alanine) 다형성 변이체이다. 도 1B 및 1C에서 융합 단백질의 다양한 부분이 도 1A에서와 같이 마크되고 변이체 발린/알라닌 아미노산은 이중 밑줄로 표시되어 있다.

도 2는 포유동물 셀 라인(cell line)에서 발현된 CD24 단백질을 정제 및 처리하기 위한 방법을 나타낸다.

도 3은 마우스(SEQ ID NO: 3)와 인간(SEQ ID NO: 1)으로부터 성숙한 CD24 단백질 사이의 아미노산 서열 변화를

나타낸다. 잠재적인 O-글리코실화 사이트는 굵게 했으며, N-글리코실화 사이트는 밑줄을 쳤다.

도 4A-C는 마우스에서 CD24Fc(CD24Ig)의 약물동력학(pharmacokinetics)의 WinNonlin 구획된 모델링 분석을 나타낸다. 개방된 원들은 3마리 마우스의 평균을 나타내고, 그리고 라인은 예측된 약물동력학적 곡선이다. 도 4A는 1mg CD24Fc의 정맥 주사. 도 4B는 1mg CD24Fc의 피하 주사. 도 4C는 곡선(AUC)하의 영역에 의해 측정된 혈액에서 항체의 총 양, 반감기 및 최대 혈중 농도의 비교. 이 차이가 통계적으로 유의적인 것은 아니지만, 전체, 피하 주사의 AUC 및 C<sub>max</sub>는 약 80% 정맥 주사임을 주목하기 바란다.

도 5는 인간 대상들에서 PK 평가 가능한 개체군(Evaluable Population)에 대한 치료에 의해 평균 혈장 CD24Fc 농도(±SD)의 플롯을 나타낸다. PK=약물동력학적, SD=표준 편차.

도 6은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc C<sub>max</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

도 7은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc AUC<sub>0-42d</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

도 8은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc AUC<sub>0-inf</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명자들은 놀랍게도, 성숙한 CD24 서열을 함유하는 단백질은 LDL-C 레벨을 낮추는 데 효과적이고, 게다가 죽상 동맥 경화증 치료 및/또는 예방, 및 죽상 동맥 경화성 심혈관 질병과 같은 심혈관 질병의 위험을 감소시키는데 유용하다는 것 발견하였다. 본 명세서에서 보다 상세하게 설명되는 바와 같이, CD24는 조혈 및 비-조혈 세포들 사이에서 광범위한 발현을 갖는 스몰 글리코실-포스파티딜-이노시톨(GPI)-앵커드(anchored) 당단백질인데, 그것은 240개의 염기쌍의 코딩 서열에 의해 인코딩된다. 80개의 아미노산 중에서, 처음 26개는 신호 펩타이드를 구성하는 반면, 마지막 23개는 GPI 테일(tail)의 부착을 가능하도록 절단을 위한 신호로서 기능한다. 그 결과, 성숙한 인간 CD24 분자는 단지 31개의 아미노산을 갖는다. 아미노산 31개는 인간 개체군 중에서 다형이다. 뉴클레오타이드 226에서 C 에서 T 전이는 알라닌(A)을 발린(V)으로의 치환을 초래한다. 이 잔여물(residue)은 절단 위치에 대해 바로 N-말단에 위치하기 때문에, 그리고 대체(replacement)는 비보존성이기 때문에, 이들 2개의 대립유전자들은 세포 표면상에서 상이한 효율로 발현될 수 있다. 카피 DNA를 이용한 형질주입 연구는 CD24<sup>v</sup> 대립유전자가 세포 표면상에서 보다 효율적으로 발현된다는 것을 입증하였다. 이에 따라, CD24<sup>v/v</sup> 말초 혈액 백혈구는 높은 레벨의 CD24를, 특히 T 세포상에서 발현했다. 이들 3개의 증거는 CD24가 MS에 대한 유전 변형 인자(modifier)인 것을 입증한다. 개체군 레벨에서, CD24<sup>v/v</sup> 유전자형은 정상적인 개체군 내에 있는 것보다 2배 이상 빈번하다. 멀티플렉스(multiplex) MS계들 중에서, CD24<sup>v</sup> 대립유전자는 건강한 대조군에 비해 MS 환자에게 우선적으로 전송된다. 게다가, 더 심각한 형태의 질병(환자들이 독립적으로 걸을 수 있는 능력을 상실할 경우, 6.0 이상에서 확장 장애 상태 스케일(Expanded Disability Status Scale)[EDSS])을 가지는 MS 환자들 중에서, CD24<sup>v/v</sup> 개인은 최초 임상 증상으로부터 EDSS 6.0에 도달하는데 평균 7년 걸렸으며, 또, CD24<sup>a/v</sup> 또는 CD24<sup>a/a</sup> 개인은 13내지 15년에 EDSS 6.0에 도달하였다. 반대로, 3'에서 디뉴클레오타이드 삭제가 CD24 메신저 리보핵산(mRNA) 영역을 비해석했으며, 그것은 CD24 mRNA 안정성을 감소시켜 CD24 발현을 감소시키며, MS 및 다른 자가면역 질환에 대해 인간을 보호한다. 지금까지, CD24는 지질 레벨에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다.

#### [0011] 1. 정의

[0012] 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시예를 설명하기 위한 목적이며, 제한하려는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 “하나(a)”, “하나(an)” 및 “그(the)” 는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0013] 본 명세서에서 레벨 범위의 설명에 대해, 그들 사이에 개입되는 레벨은 서로 동일한 정도의 정밀도를 갖는 것으로 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6-9의 범위에 대해, 7 및 8은 6과9에 추가하여 고려되며, 6.0-7.0의 범위에 대해, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0은 명시적으로 고려된다.

[0014] “펩타이드” 또는 “폴리펩타이드” 는 아미노산의 링크된 서열이며 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0015] “실질적으로 동일한” 은 제1 및 제2 아미노산 서열이, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,

41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300 아미노산의 영역에 걸쳐, 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%인 것을 의미할 수 있다.

[0016] 질병으로부터 동물을 보호하는 것을 언급할 경우, “치료” 또는 “치료하는”은 질병을 예방, 억제, 억압 또는 완진하게 제거하는 것을 의미한다. 질병을 예방하는 것은 질병의 개시 이전에 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 질병을 억제하는 것은 질병의 유도 후 임상적 출현 전에 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 질병을 억압하는 것은 질병의 임상적 출현 후 동물에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0017] “변이체”는 삽입, 삭제, 또는 아미노산의 보존적 치환에 의해 아미노산 서열과 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미할 수 있다. “생물학적 활성”의 대표적인 예는 틀-유사 수용체에 결합하는 능력 및 특정 항체에 의해 결합되도록 하는 능력을 포함한다. 또한, 변이체는 적어도 하나 이상의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 기준 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 유사한 특성(예를 들어, 친수성, 하전 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 아미노산을 대체하는 것은 본 기술 분야에서 통상 작은 변화를 포함하는 것으로 인식된다. 이러한 작은 변화는, 본 기술 분야, Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132(1982)에서 알 수 있는 바와 같이, 아미노산의 수치요법 지수(hydrophobic index)를 고려함으로써, 부분적으로 식별될 수 있다. 아미노산의 수치요법 지수는 그의 소수성 및 전하를 고려하는데 기본을 두고 있다. 유사한 수치요법 지수의 아미노산은 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있다는 것이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 하나의 측면에서,  $\pm 2$ 의 수치요법 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 초래하는 치환을 보여주는데 사용될 수 있다. 펩타이드의 맥락에서 아미노산의 친수성을 고려하면 그 펩타이드의 최대 지역 평균(local average) 친수성을 계산할 수 있고, 항원성 및 면역원성과 잘 상관되는 것으로 보고되어 있는 유용한 측정이 가능하다. 미국 특허 제4,554,101호는 본 명세서에 참고로 전체 포함된다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환이 생물학적 활성, 예를 들어 본 기술 분야에서 알 수 있는 바와 같은, 면역원성을 보유하는 펩타이드를 초래할 수 있다. 서로  $\pm 2$  내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 치환이 실행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값은 그 아미노산의 특정 측체에 의해 영향을 받는다. 이러한 관찰에 따라, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은, 아미노산의 상대적 유사성에, 특히 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 드러날 경우, 이들 아미노산의 측체에 의존하는 것으로 이해되어야 한다.

[0018] **2. CD24**

[0019] 본 명세서에 CD24 단백질이 제공되며, 그것은 성숙한 인간 CD24의 아미노산 서열 또는 다른 포유류로부터의 아미노산 서열, CD24의 세포외 도메인(ECD)에 대응하며, 또는 이의 변이체를 포함한다. 전술한 바와 같이, 성숙한 인간 CD24 단백질의 서열은 그것의 C-말단 단부: SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK(V/A)(SEQ ID NO: 1)에 알라닌(A)이 발린(V) 잔여물로 가변할 수 있는 31개의 아미노산 길이이다.

[0020] C-말단 발린 또는 알라닌은 면역원성일 수 있으며 CD24 단백질로부터 면역원성을 감소시키기 위해 제거될 수 있다. 따라서, CD24 단백질은 아미노산 서열 또는 C-말단 아미노산: SETTTGTSSNSSQSTSNGLAPNPTNATTK(SEQ ID NO: 2)이 부족한 성숙한 인간 CD24를 포함할 수 있다.

[0021] 마우스 및 인간으로부터 성숙한 CD24 단백질의 아미노산 서열에서 상당한 서열 변화에도 불구하고, 인간 CD24Fc가 마우스에서 활성인 것으로 나타난 바와 같이, 이들은 기능적으로 등가이다. 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열은, 도 3에 나타나는 바와 같이, 마우스 단백질(39% 동일성(identity); Genbank accession number NP\_033976)과 일부 서열 보존을 나타낸다. 그러나 CD24 ECD가 종(species)에 따라 길이가 단지 27-31개의 아미노산이며, Siglec 10/G와 같은 그것의 수용체(들) 중 일부에 대한 결합이 그것의 시알산 및/또는 당단백질의 갈락토오스당에 의해 매개되는 경우, 동일성 비율(percent identity)이 더 높지 않다는 것은 놀라운 것은 아니다. 인간 Siglec-10(GenBank accession number AF310233)의 세포외 도메인과 그의 뮤린(murine) 동족체 Siglec-G(GenBank accession number NP\_766488) 수용체 단백질들 사이의 아미노산 서열 동일성은 63%이다. C-말단 및 글리코실화 사이트의 부존재하에서 마우스와 인간 CD24 사이의 서열 보존의 결과로서, 성숙한 CD24 단백질의 유의한 변화는 CD24 단백질을 사용하여 용인될 수 있으며, 특히 이들 변화가 C-말단에 보존된 잔여물에 영향을 주지 않거나, 마우스 또는 인간 CD24로부터 글리코실화 사이트에 영향을 주지 않는 경우에 용인될 수 있다. 따라서, CD24 단백질은 성숙한 뮤린 CD24의 아미노산 서열: NQTSVAPFPGNQNISASPNTNATTRG(SEQ ID NO: 3)을 포함할

수 있다.

[0022] 인간 CD24 ECD의 아미노산 서열은 마우스에 비하여 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이 단백질(52% 동일성; UniProt accession number UniProtKB-I7GKK1)이 더 많은 서열 보존을 나타낸다. 또, ECD가 이들 중에서 길이가 단지 29-31개의 아미노산이며, 그리고 당 잔여물의 역할이 그것의 수용체(들)에 결합인 경우, 동일성 비율이 더 높지 않다는 것을 고려하면 이것은 놀라운 것은 아니다. 시노몰구스 Siglec-10 수용체의 아미노산 서열은 결정되어 있지 않지만, 인간과 레수스(rhesus) 원숭이 Siglec-10(GenBank accession number XP\_001116352) 단백질 사이의 아미노산 서열 동일성은 89%이다. 따라서, CD24 단백질이 성숙한 시노몰구스(또는 레수스) 원숭이 CD24: TVTTSAPLSSNSPQNTSTTPNPANTTKA (SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 또한 포함할 수 있다.

[0023] CD24 단백질은 가용될 수 있다. CD24 단백질은 N-말단 신호 펩타이드를 포함할 수 있어, 단백질을 발현하는 세포로부터 분리되는 것을 가능하게 한다. 신호 펩타이드 서열은 아미노산 서열 MGRAMVARLGLGLLLALLLPTQIYS(SEQ ID NO: 4)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 다른 막관통(transmembrane) 또는 분비 단백질, 또는 본 기술 분야에 알려진 기존의 신호 펩타이드로부터 변형된 것에서 발견되는 것 중 임의의 것일 수 있다.

[0024] a. 용합

[0025] CD24 단백질은 그것의 N-또는 C-말단 단부에서 단백질 태그에 용합될 수 있다. 단백질 태그는, 인간 또는 마우스 또는 다른 종일 수 있는, 포유동물 Ig 단백질의 일부를 포함할 수 있다. 상기 일부는 Ig 단백질의 Fc 영역을 포함할 수 있다. Fc 영역은 힌지 영역, Ig 단백질의 CH2, CH3, 및 CH4 도메인 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. Ig 단백질은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgA일 수 있으며, 그리고 Fc 영역은 힌지 영역, 및 Ig의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. Fc 영역은, SEQ ID NO: 7의 서열을 가질 수 있는, 인간 면역글로불린 G1(IgG1) 아이소타입(isotype)를 포함할 수 있다. Ig 단백질은 또한 IgM일 수 있으며, 그리고 Fc 영역은 힌지 영역과 IgM의 CH2, CH3, 및 CH4 도메인을 포함할 수 있다. 단백질 태그는 단백질의 정제를 돕는 친화성 태그일 수 있으며, 또는 기능 단백질(functional protein)의 가용성 및 회수(recovery)를 향상시키는 가용성-향상 태그(solubility-enhancing tag)일 수 있다. 또한, 단백질 태그는 CD24 단백질의 원자가를 증가시킬 수 있다. 단백질 태그는 또한 GTS, His, FLAG, Myc, MBP, NusA, 티오레독신(TRX), 스몰 유비퀴틴-유사 변형제(SUMO), 유비퀴틴(Ub), 알부민, 또는 카멜리드(Camelid) Ig를 포함할 수 있다. 용합 단백질의 제조 방법 및 용합 단백질의 정제방법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0026] 임상 전 연구에 기초하여, 예들로부터 확인된 용합 단백질 CD24Fc의 구성에 대해, 30개의 아미노산의 네이티브 CD24 분자의 절단된 형태, 즉, GPI 신호 절단 사이트(즉, SEQ ID NO: 2를 갖는 성숙한 CD24 단백질) 전에 최종 다형 아미노산이 결합된 것이, 사용되었다. 성숙한 인간 CD24 서열은 인간 IgG1 Fc 도메인(SEQ ID NO: 7)에 용합된다. 전체 길이 CD24Fc 용합 단백질은 SEQ ID NO: 5에 제공되며(도 1), 그리고 세포(즉, 절단되는 신호 서열이 결합된)로부터 분리되는 CD24Fc 용합 단백질의 처리된 버전은 SEQ ID NO: 6으로 제공된다. IgG1 Fc에 용합된 성숙한 CD24의 처리된 다형 변이체(즉, SEQ ID NO: 1을 갖는 성숙한 CD24 단백질)는 SEQ ID NO: 11 또는 12를 포함할 수 있다.

[0027] b. 생산

[0028] CD24 단백질은 심하게 글리코실화될 수 있으며, 그리고 면역 세포의 상호 자극 및 손상-관련 분자 패턴 분자(Damage-associated molecular pattern molecule)(DAMP)와의 상호 작용과 같은 CD24의 기능에 관여할 수 있다. CD24 단백질은 진핵 발현 시스템을 이용하여 제조할 수 있다. 발현 시스템은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은, 포유동물 세포에서 벡터로부터의 발현을 수반할 수 있다. 또한, 시스템은 진핵 세포를 감염시키는데 사용될 수 있는 복제 결손 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터일 수 있다. CD24 단백질은 또한 세포 계층에 통합된 벡터 또는 벡터의 부분으로부터 CD24 단백질을 발현하는 안정적인 셀 라인으로부터 생산될 수 있다. 안정적인 셀 라인은 통합된 복제 결손 레트로바이러스 벡터로부터 CD24 단백질을 발현시킬 수 있다. 발현 시스템은 GPEX™가 될 수 있다.

[0029] c. 약학적 조성물

[0030] CD24 단백질은 약학적 조성물에 함유될 수 있으며, CD24 단백질의 약학적으로 허용 가능한 양을 포함할 수 있다. 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 캐리어(carrier)를 포함할 수 있다. 약학적 조성물은 용매를 포함할 수 있으며, 그것은 확장 기간 동안 CD24 단백질이 안정되게 유지할 수 있게 한다. 용매는 PBS일 수 있으며, 그것은 CD24 단백질이 -20℃(-15~-25℃)에서 적어도 66개월 동안 안정하게 유지될 수 있게 할 수 있다. 용매는 CD24 단백질을 다른 약물과 조합하여 수용할 수 있는 것이 가능할 수 있다.

[0031] 약학적 조성물은 주사 또는 연속 주입을 포함하는, 그러나 이에 한정되지 않는, 비경구 투여를 위해 제제될 수 있다. 주사용 제제는 현탁액, 용액, 또는 유성 또는 수성 비히클(vehicle)의 에멀전의 형태일 수 있으며, 그리고 서스펜션화, 안정화 및 분산제를 포함하는, 그러나 이에 한정되지 않는, 제제를 함유할 수 있다. 조성물은 또한 이에 한정되는 것은 아니지만, 살균, 멸균 주사용 증류수를 포함하는 적합한 비히클과 함께 재구성하기 위한 분말 형태로 제공될 수 있다.

[0032] 또한, 약학적 조성물은 데포제로서 제형화될 수 있으며, 그것은 이식 또는 근육 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 조성물은 적합한 중합체 또는 소수성 재료(예를 들어, 수용 가능한 오일의 에멀전과 같은), 이온 교환 수지, 또는 난용성 유도체(예를 들어, 난용성 염과 같은)로 제형화 될 수 있다.

[0033] **d. 용량**

[0034] CD24 단백질의 용량은 허용 가능한 독성 및 임상적 효능을 가지는 용량을 결정하는 임상적 실험을 통해 궁극적으로 결정될 수 있다. 초기 임상 용량은 설치류 및 비-인간 영장류에서 약물동력학 및 독성 연구를 통해 추정될 수 있다. CD24 단백질의 용량은 0.01mg/kg 내지 1000mg/kg일 수 있으며, 그리고 1 내지 500mg/kg일 수 있으며, 원하는 양의 LDL-C-저하 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. CD24 단백질은 정맥 주사 또는 피하 또는 점막 내(즉, 강(cavity) 또는 기관의 벽 내) 주사에 의해 투여될 수 있으며, 그 용량은 10-1000mg, 10-500mg, 10-240mg, 10-120mg, 또는, 대상이 인간일 경우, 10, 30, 60, 120, 또는 240mg일 수 있다.

[0035] **3. 치료 방법**

[0036] CD24 단백질은, LDL-C 레벨이 낮은 대상에게 투여될 수 있으며, 그리고 정상적인 범위 이상으로 더 상승된 대상에 투여될 수도 있다. LDL-C 레벨을 낮추기 위해 대상에게 투여될 수도 있다. 정상 범위는, National Cholesterol Education Panel Adult Treatment Panel(ATP) III 또는 그에 대한 2005 update(Circulation 2002; 106:3143-421; 및 J Am Coll Cardiol. 2004 Aug 4;44(3):720-32에 기술된; 그들 모두의 내용은 본 명세서에 참조로서 포함된다), 또는 National Institute for Health and Care Excellence(NICE)에 의해 발표된 것 같은, 본 기술 분야에 알려진 표준에 의해 정의될 수 있다. 대상은 리소좀 산 리파제(lysosomal acid lipase)(LAL) 결핍증, 가족성 과콜레스테롤 혈증, 또는 고지혈증을 가질 수 있다. 또한, CD24 단백질은 죽상 동맥 경화증을 치료 또는 예방, 또는, 죽상 동맥 경화성 심혈관 질병(ASCVD) 발현예일 수 있는, 심혈관 질병 발현예의 위험을 낮추기 위해서 대상에게 투여될 수 있다. ASCVD 발현에는 급성 관상동맥 증후군, 심근 경색, 안정적인 또는 불안정한 협심증, 관상동맥 또는 다른 동맥 재형성, 뇌졸중, 일과성 뇌허혈 발작, 또는 죽상 동맥 경화성 근원(origin)인 것으로 추정되는 말초 동맥 질환일 수 있다. 대상은 인간과 같은 포유동물일 수 있다.

[0037] 대상은 남성 또는 여성일 수 있다. 대상은 임의의 연령일 수 있지만, 특히 40 내지 75세, 또는 75세 이상일 수 있다. 대상은 70mg/dL, 75mg/dL, 또는 190mg/dL과 같거나 또는 큰 LDL-C를 가질 수 있다. 또한, 대상은 당뇨병 또는 비-당뇨병일 수 있고, 40-75세일 수 있고, 그리고 70 내지 189mg/dL의 LDL-C를 갖는다. 대상은 7.5% 이상, 또는 5 내지 7.5%의 10년 ASCVD 위험(비치명적인 심근경색, 관상동맥 질병 사망, 또는 비치명적인 및 치명적인 뇌졸중으로서 정의된)을 가질 수 있다. 대상은, LDC 저하가 2013 American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines(Stone NJ, et al., 2013 ACC/AHA guideline of the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, J Am Coll Cardiol 2014;63:2889-934)에 따라 추천된 특성을 갖는 대상일 수 있다. 대상은 가족형 과콜레스테롤 혈증을 가질 수 있으며, 그것은 LDL 수용체 유전자, 아포지질단백질 B 유전자, 또는 프로-단백질 전환효소 서브틸라신/켁신타입(kexintype) 9 유전자에서 변이에 의해 야기될 수 있다.

[0038] 대상은 스타틴과 같은 LDL-C-저하 약물로 이전에 처리되었을 수 있다. 또한, 대상은 그 약물의 결과로서 부작용(adverse event)을 경험했었을 수 있다. 부작용은 통증, 누름 통증, 결립, 경련, 쇠약, 또는 일반적인 피로와 같은 근육 증상일 수 있으며, 그리고 근육 부작용(이는 정상적인 상한치의 10배 초과(>10)가 될 수 있는)에 대한 증가된 위험을 나타내는 크레아틴 포스포키나아제 레벨일 수 있다. 대상은 다른 콜레스테롤 저하 약물에 대한 치료에 대해 반항적일 수 있으며, 스타틴일 수 있는, 다른 약물로 치료되어진 후, 75mg/dL 이상보다 큰 LDL-C를 가질 수 있다. 대상은 이식편 대 숙주병(graft vs. host disease)을 가질 수 있으며, 그리고 이식에 앞서 대상의 LDL-C와 비교하여 이식한 후의 LDL-C에서 10% 이상 증가를 나타냈었을 수 있다. 대상은 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 또는 자가면역 또는 염증성 질병을 가질 수 있다.

[0039] **a. 투여**

[0040] 약학적 조성물의 투여 경로는 비경구일 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 척추강내, 관절내 및 직접 주사를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 약학적 조성물은 인간 환자, 고양이, 개, 큰 동물, 또는 조류에 투여될 수 있다. 조성물은 하루에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12회 투여될 수 있다.

[0041] **b. 병행 치료**

[0042] CD24 단백질은 스타틴, 담즙산-결합 수지, 섬유산, 니아신, 에제티미브를 포함하는 약물, 또는 PCSK9의 기능을 길항하거나 차단하는 항체 또는 다른 억제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는, LDL 수용체를 증가시키는 약물과 같은 다른 치료와 병용할 수 있다. CD24 단백질 및 다른 약물은 함께 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0043] CD24 단백질은 다른 치료와 동시에 또는 규칙적으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 “동시” 또는 “동시에”는 CD24 단백질 및 다른 치료가 48시간, 바람직하게는 24시간, 더욱 바람직하게는 6시간 이내에, 그리고 가장 바람직하게는 3시간 이하에 각각이 투여된다는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “규칙적으로”는 다른 치료와 상이한 시간에 그리고 반복 투여에 대한 특정 빈도로 제제의 투여를 의미한다.

[0044] CD24 단백질은 다른 치료 전에, 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 1분을 포함하는 임의의 시점에 투여될 수 있다. CD24 단백질은 CD24 단백질의 두 번째 치료 전에, 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 및 1분을 포함하는 임의의 시점에 투여될 수 있다,

[0045] CD24 단백질은 또 다른 치료 후, 약 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간, 28시간, 30시간, 32시간, 34시간, 36시간, 38시간, 40시간, 42시간, 44시간, 46시간, 48시간, 50시간, 52시간, 54시간, 56시간, 58시간, 60시간, 62시간, 64시간, 66시간, 68시간, 70시간, 72시간, 74시간, 76시간, 78시간, 80시간, 82시간, 84시간, 86시간, 88시간, 90시간, 92시간, 94시간, 96시간, 98시간, 100시간, 102시간, 104시간, 106시간, 108시간, 110시간, 112시간, 114시간, 116시간, 118시간, 120시간을 포함하는 임의의 시점에 투여될 수 있다. CD24 단백질은 이전 CD24 치료 후 이전에, 약 120시간, 118시간, 116시간, 114시간, 112시간, 110시간, 108시간, 106시간, 104시간, 102시간, 100시간, 98시간, 96시간, 94시간, 92시간, 90시간, 88시간, 86시간, 84시간, 82시간, 80시간, 78시간, 76시간, 74시간, 72시간, 70시간, 68시간, 66시간, 64시간, 62시간, 60시간, 58시간, 56시간, 54시간, 52시간, 50시간, 48시간, 46시간, 44시간, 42시간, 40시간, 38시간, 36시간, 34시간, 32시간, 30시간, 28시간, 26시간, 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 25분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 및 1분을 포함하는 임의의 시점에 투여될 수 있다.

[0046] **4. CD24 단백질 활성을 모니터링하는 방법**

[0047] 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 활성은 대상에서 LDL-C의 농도를 검출함으로써 모니터링될 수 있다. 대상은 CD24 단백질로서 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주병, 면역-매개 조직 손상 등에 대한 치료를 받고 있을 수 있다. LDL-C의 농도는 대상에서 CD24 단백질 활성의 레벨을 나타낼 수 있으며, 여기서 환자의 LDL-C의 감소는 더 큰 CD24 단백질 활성인 것을 나타낸다. 이 방법은 대상으로부터 샘플을 획득하고, 샘플에서 LDL-C의 양을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 샘플은 혈청 또는 혈장과 같은 혈액 샘플일 수 있다. LDL-C 농도를 측정하는 방법은, 콜레스테롤 에스테라아제 및 콜레스테롤 옥시다아제 치료에 따라 ELISA 기반 분석 또는 비색/형광 분석과 같이 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. LDL-C의 양은 Friedewald 계산에 의해 측정될 수 있으며,

샘플에서 측정된 전체 콜레스테롤, 트리글리세리드, 및 고밀도 지질단백질 콜레스테롤(HDL-C)의 양에 기초하여 LDL-C의 양을 계산하는 것을 포함할 수 있다. HDL-C의 양은 텍스트란 황산염-Mg<sup>2+</sup>에 의한 침전 과정 또는 직접 HDL-C 분석에 의해 측정될 수 있다. 또한, LDL-C의 양은, DIRECT LDL™ 분석, 균질 N-GENEOUS™ LDL 분석, 또는 ApoB계 방정식:  $0.41TC - 0.32TG + 1.70ApoB - 0.27$ , (Clin Chem 1997;43:808-815; 이들 내용은 본 명세서에 참조로서 포함되어 있다)으로부터 유도한 계산된 LDL-C 값에 의해 측정될 수 있다. LDL-C의 레벨은 시간 경과 및 CD24 단백질 치료 과정 동안 치료에 대한 반응을 모니터링하기 위해 모니터링될 수 있다.

[0048] 본 명세서에 기술되어 있거나 또는 본 기술 분야에 알려져 있는 권고를 처리하기 위해, 대상에게 투여되어지는 CD24 단백질의 양은 LDL-C를 이용하여 검출된 CD24 단백질 활성의 레벨에 기초하여 조절될 수 있다. LDL-C의 레벨은 기간 경과 또는 CD24 단백질 치료의 과정 동안 모니터링될 수 있다. 대상에서 LDL-C 농도가 정상적인 범위 내의 레벨로 감소된다면, CD24 단백질의 용량을 낮추거나 또는 이를 덜 빈번하게 투여하는 것과 같이 함으로써, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 감소될 수 있다. LDL-C 농도가 변하지 않거나 정상적인 범위 이상으로 유지된다면, CD24 단백질의 용량을 증가시키거나 또는 더욱 빈번하게 투여하는 것과 같이 함으로써, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 증가될 수 있다. LDL-C의 대안으로서, 또한, LDL 입자(LDL-P)의 농도는 CD24 단백질 활동을 모니터링하기 위해 측정될 수 있다. LDL-P 농도는 NMR을 이용하여 직접 검출될 수 있다.

[0049] 또한, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 레벨이 모니터링될 수 있으며, 그것은 대상으로부터 샘플을 수득하는 것 그리고 샘플에서 CD24 단백질의 양을 검출하는 것을 포함하는 방법에 의해서 될 수 있다. 샘플은 혈청 또는 혈장과 같은 혈액 샘플일 수 있다. 단백질 검출 방법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있다. 샘플에서 CD24 단백질은, ELISA, Gyros, MSD, Biacore, AlphaLISA, Delfia, Singulex, Luminex, Immuno-PRC, 세포 기반 분석(Cell-based assay), RiA, 웨스턴 블롯(Western blot), 친화성 컬럼(affinity column) 등을 포함하는 면역분석법(immunoassay)과 같은 임의의 단백질 검출 방법에 의해 검출될 수 있다. ELISA 방법은 샌드위치 ELISA 또는 경쟁적 ELISA 일 수 있다. 예를 들어, ELISA는 샘플을 항-CD24 단백질 항체에 접촉시키는 것, 항-CD24 단백질 항체에 결합하는 라벨된 항체와 CD24 단백질-CD24 단백질 항체 복합체(complex)를 접촉시키는 것, 그리고 라벨에 의해 생성된 신호를 검출하여 라벨된 항체의 양을 측정하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 신호의 양은 샘플에서 CD24 단백질의 양에 상관된다.

[0050] 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 CD24 단백질에 대한 약물동력학적 파라미터에 기초하여 조절(예를 들어, 투여량 및 투여 빈도를 조절하는 것에 의해)될 수 있다. 예를 들어, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 1ng/ml보다 큰 혈장 CD24 농도를 얻도록 조절될 수 있다. 다른 예에서, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 1ng/mL보다 큰 정상 상태 혈장 농도를 유지하도록 조절된다. 다른 예에서, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은 적어도 약 1ng/mL의 CD24 단백질의 C<sub>max</sub>를 얻도록 조절될 수 있다. 또 다른 예에서, 대상에게 투여되는 CD24 단백질의 양은, 적어도 약 400,000ng\*hr/mL의 CD24 단백질의 AUC<sub>0-inf</sub>에 의해 정의된 바와 같은, 약물 노출 레벨(exposure level)을 달성하기 위해 조절될 수 있다.

[0051] 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 예시된 다수의 양태를 갖는다.

[0052] **실시예 1**

[0053] **가용성 CD24 단백질의 제조**

[0054] 성숙한 CD24의 서열을 IgG1 Fc에 융합하였다. CD24 융합 단백질의 아미노산 조성물을 도 1에 제공했다. CD24Fc 융합 단백질의 발현을 구동하는 복제 결손 레트로바이러스 벡터를 생성하였다. GPEX™(유전자 제품 발현의 두문자어)시스템은 몇 가지 중요한 장점을 제공하며, 그 중 가장 중요한 것은, 평균, >1000 삽입/셀이지만 단지 1카피/삽입이다. 또한, 레트로바이러스를 전사 활성 유전자좌(locus)에 우선적으로 삽입했기 때문에, GPEX™(참고: 상표등록출원 중인 상표(등록되지 않은))은 타겟된 단백질의 높은 레벨의 발현을 초래했다. CD24Fc의 높은 수율을 생성하는 안정한 셀 라인을 생성하였다. 또한, GLP 등급 제품 45g 및 cGMP 등급 제품 100g을 생산하였다. 생물반응기(bioreactor)로부터 수확된 배양 배지의 다운스트림 처리(downstream processing)를 위해 사용된 방법은 이하의 흐름도(도 2)에 요약하였다.

[0055] **수확 정화**

[0056] 생물반응기 배양 배지는 Millipore Opticap 0.22um 필터 뒤에 Cuno 60M02 최대화 깊이 필터를 사용하여 정화하였다. 여과액을 멸균 수집백에 수집하였다. ELISA에 의해 CD24-Fc 수율 정량화를 위해 샘플을 얻었다.

- [0057] **단백질 A 캡처**
- [0058] 정화된 배지를 단백질 A 수지(GE Healthcare MabSelect)의 컬럼(column)을 통해 수지(ELISA에 기초한)의 16g/L를 초과하지 않는 농도 및 4분의 접촉시간으로 통과시켰다. 컬럼을 평형 완충액(50mM Tris+0.15M 염화나트륨 pH7.5)으로 세척하고, 그 후 5cv에 대해 10mM 시트르산 나트륨/시트르산 pH6.0으로 세척하였다. 결합된 CD24Fc를 10mM 시트르산 나트륨/시트르산 pH3.5를 이용하여 컬럼으로부터 용출시켰다.
- [0059] **바이러스 불화화**
- [0060] 단백질 A 용출 분획을 2M 염산의 첨가로 pH3.0에 즉시 있게 하고, 주위 온도에서 30분 동안 이 pH에서 유지시켰다. 그 후, 1M 트리스 염기(Tris base)의 첨가로 pH5.0에 있게 하고, 0.65um 유리섬유 필터(Sartorius Sartopure GF2) 및 0.2um(Sartorius Sartopure 2)을 이용하여 멸균 수집백으로 정화하도록 여과시켰다.
- [0061] **SP-세파로오스 크로마토그래피**
- [0062] 바이러스 불활성화된 물질을 수지(1.22의 A280nm=1mg/mL에 기초한)의 25g/L를 초과하지 않는 농도 및 250cm/hr의 선형 유동율(linear flow rate)로 SP-세파로오스(GE Healthcare)의 컬럼에 적용시켰다. 컬럼을 평형 완충액(10mM 시트르산 나트륨/시트르산 pH5.0)로 세척하고 결합된 CD24Fc를 10mM 시트르산 나트륨/시트르산+0.2M 염화나트륨 pH5.0을 사용하여 컬럼으로부터 용출시켰다. 용출액은 멸균 수집 백으로 수집되었다.
- [0063] **Mustang Q 크로마토그래피**
- [0064] SP-세파로오스 용출을 1M 트리스 염기의 첨가에 의해 pH7.5로 조절하고, WFI로 희석하여 전도도를 감소시켰다. 희석된 물질은 수지(1.22의 A280nm=1mg/mL에 기초한)의 0.5g/L를 초과하지 않는 농도 및 5컬럼 볼륨/분의 유동률로 Mustang Q 필터(Pall)에 적용시켰다. 필터를 평형 완충액(10mM Tris pH7.5)으로 세척하고 CD24-Fc는 흐름을 통해 포함되어 멸균 수집백으로 수집되었다.
- [0065] **바이러스 여과(Viral Filtration)**
- [0066] 그런 다음, 0.2um 필터 및 Millipore NFP 바이러스 필터(공칭 기공 크기 20nm)를 통해 30psi의 일정한 압력으로 여과되어 멸균 수집백으로 수집되었다.
- [0067] **농축 및 최종 제형**
- [0068] 생성물을 농축시키고, 10kDa 한외 여과막(Millipore Prep/Scale)을 이용하여 280nm에서의 흡광도에 의해 측정된 약 10mg/mL 최종 농도로 10mM 인산나트륨, 150mM 염화나트륨 pH 7.2 내로의 투석 여과(diafiltered)하였다. 분석 샘플은 바이오 안전 캐비닛(biosafety cabinet)에 있는 동안 벌크(bulk)로부터 인출되었다. 라벨링(labeling)을 수행하고, 벌크 부분 표본(aliquots)들을 방출이 있을 때까지 2 내지 8℃로 저장하면서, 샘플을 테스트를 위해 QC로 전달하였다.
- [0069] **실시예 2**
- [0070] **마우스에서 CD24 약물동력학**
- [0071] 1mg의 CD24Fc(CD24Fc)를 경험이 없는(naive) C57BL/6 마우스에 주사하고 상이한 시점(5분, 1시간, 4시간, 24시간, 48시간, 7일, 14일 및 21일)에 각 시점에서 3개의 마우스에 대하여 혈액 샘플을 수집했다. 혈청을 1:100으로 희석하고 항체 캡처로서 정제된 항-인간 CD24(3.3µg/ml) 및 항체 검출로서 염소(goat) 항-인간 IgG Fc(5µg/ml)가 결합된 페록시다아제를 이용하는 샌드위치 ELISA를 이용하여 CD24Fc의 레벨을 측정하였다. 도 4a에 도시된 바와 같이, CD24Fc의 붕괴 곡선은 단백질의 전형적인 이상성(biphase) 붕괴를 나타내었다. 제1 생물학적 분포(biodistribution) 단계(phase)는 12.4시간의 반감기를 가졌다. 제2 단계는 중앙 구획으로부터 1차 제거의 모델을 따른다. 제2 단계에 대한 반감기는 9.54일이었으며, 그것은 생체 내 항체의 것과 유사하다. 이러한 데이터는 융합 단백질이 혈류에서 매우 안정함을 시사한다. 융합 단백질이 피하 주사되는 또 다른 연구에서, 9.52일의 거의 동일한 반감기가 관찰되었다(도 4b). 보다 중요하게, CD24Fc가 혈액에서 피크 레벨에 도달하는데 대략 48시간 걸리는 반면, 혈액에서 융합 단백질의 총량(total amount)은, AUC에 의해 측정된 바와 같이, 어떠한 주입 경로에 의해서도 실질적으로 동일하였다. 따라서, 치료 관점에서, 상이한 주입 경로는 약물의 치료 효과에 영향을 주지 않아야 한다. 이러한 관찰은 영장류 독성 및 임상 시험에 대한 실험 설계를 크게 단순화하였다.
- [0072] **실시예 3**
- [0073] **CD24는 LDL-C 레벨을 낮춘다**

[0074] 이 실시예는 CD24가 LDL-C를 낮추는 것을 증명한다. 베이스라인으로부터 혈장에서 공복 LDL-C의 변화는 아래에 보다 상세하게 설명되는 임상 연구에서 분석된다(본 실시예의 방법 부분을 참조). 코호트(Cohort) 1(CD24Fc 10mg 그룹)에 대해 1일째, 7일째, 및 42일째에서 얻은 샘플 중에서 공복 LDL-C 레벨을 측정하였다. 코호트 2(CD24Fc 30mg 그룹)에 대한 출발에서, 이 지질 샘플링은 14일째를 포함하도록 확장되었다. 이 데이터는 표 1에 요약되어 있다. 코호트 1에서 불완전한 데이터 세트 때문에, 코호트 2-5를 사용하여 LDL-C 레벨의 용량-의존성 감소를 분석하였다. 통계적으로 유의한 용량 의존성 감소가 관찰되었다(표 1).

[0075] [표 1] 베이스라인(U0, 100%로 정의된)으로부터 7일째(U1), 14일째(U2) 및 42일째(U3)에 LDL-C 레벨에서 변화

Dose	Obs	Variable	Label	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
10mg								
	6	u0	Baseline LDL	6	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1	7 days LDL ratio	5	99.6785886	8.5665505	87.0370370	107.7586207
		u2	14 days LDL ratio	0	.	.	.	.
		u3	42 days LDL ratio	6	102.9957054	5.3134796	96.8085106	110.5769231
30mg								
	6	u0	Baseline LDL	6	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1	7 days LDL ratio	6	96.9190313	9.5257894	86.9047619	113.4328358
		u2	14 days LDL ratio	6	97.5816504	15.2482354	84.5238095	122.3880597
		u3	42 days LDL ratio	6	106.1959745	8.2383407	95.2830189	113.4328358
60mg								
	6	u0	Baseline LDL	6	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1	7 days LDL ratio	6	90.7620588	12.6697467	72.0720721	106.1728395
		u2	14 days LDL ratio	6	102.5671170	5.2461286	96.5517241	110.3773585
		u3	42 days LDL ratio	6	105.1546943	13.4340830	93.2773109	127.1604938
120mg								
	6	u0	Baseline LDL	6	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1	7 days LDL ratio	6	87.1476632	16.0595374	61.7391304	106.4516129
		u2	14 days LDL ratio	6	95.2625418	11.8341667	83.4782609	116.1290323
		u3	42 days LDL ratio	6	100.1377165	9.9404474	87.1794872	112.3456790
240mg								
	6	u0	Baseline LDL	6	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1*	7 days LDL ratio	6	84.6472221	7.6553896	71.5596330	94.0476190
		u2*	14 days LDL ratio	5	90.1393086	5.2501807	86.2385321	99.0825688
		u3	42 days LDL ratio	6	107.0369419	14.7154796	79.8449612	121.1009174
Control								
	10	u0	Baseline LDL	10	100.0000000	0	100.0000000	100.0000000
		u1	7 days LDL ratio	10	93.7350811	8.9747121	83.7837838	107.1428571
		u2	14 days LDL ratio	8	104.5965396	13.8625952	83.7837838	125.2631579
		u3	42 days LDL ratio	10	102.6699920	16.2815599	77.0270270	138.1578947

[0076]

[0077] \*P<0.05 플라시보 그룹과 비교할 경우, 스튜던트 t테스트(student t-test)

[0078] 참조로서 코호트 1을 사용하여, 용량-및 시간-의존성 방식으로 CD24Fc가 LDL-C 레벨을 감소하였는지를 알아보았다. 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, CD24Fc의 10mg을 받은 코호트 1과 비교하면, LDL-C 레벨의 유의적인 용량-의존성 감소가 관찰되었다(p<0.0001).

[0079] [표 2] 코호트 1(참조와 같이 최저 용량)을 사용하여, GEE 모델에 의해 코호트들에서 용량 및 시간-의존성 LDL-C 감소

Parameter	Standard		95% Confidence		Z	Pr >  Z
	Estimate	Error	Limits			
Intercept	98.0544	5.4745	87.3245	108.7842	17.91	<.0001
time	1.6471	2.1861	-2.6375	5.9317	0.75	0.4512
30mg	3.7167	7.3244	-10.6389	18.0722	0.51	0.6118
time*30mg	-1.4733	3.5435	-8.4183	5.4718	-0.42	0.6776
60mg	-25.4898	14.4124	-53.7377	2.7581	-1.77	0.0770
time*60mg	10.7245	5.0225	0.8805	20.5685	2.14	0.0327
120mg	-21.2684	9.4771	-39.8431	-2.6936	-2.24	0.0248
time*120mg	6.6669	3.9357	-1.0468	14.3806	1.69	0.0903
240mg	-15.8681	6.9247	-29.4402	-2.2960	-2.29	0.0219
time*240mg	5.4390	2.8825	-0.2106	11.0887	1.89	0.0592

[0080]

[0081] LDL-C의 통계적으로 유의한 용량-의존성 감소가 관찰되었으며, 이는 CD24Fc가 인간 환자에서 LDL-C를 낮추는 데 효과적임을 나타낸다.

[0082] 방법

[0083] 이것은 단계 I(Phase I), 랜덤화, 이중 맹험법, 플라시보-조절(placebo-controlled), 안전성을 평가하기 위한 단일 상승 용량 연구, 내성, 및 건강한 남성 및 여성 성인 대상에서 CD24Fc의 PK이었다. 각각 8명의 대상의 5개 코호트에서 총 40명의 대상을 이 연구에 등록하였다. 각 코호트에서 8명의 대상 중 6명은 연구 약물을 투여받았고 2명의 대상은 플라시보(0.9% 염화나트륨, 염류 용액(saline))를 투여받았다. 제1 코호트를 10mg로 투여하였다. 후속 코호트들은 30mg, 60mg, 120mg의 CD24Fc를 투여받거나 또는 플라시보를 매치시켜 적어도 3주 떨어져 투여하여 각각의 이전 코호트에 대한 안전성 및 내성의 검토가 가능하게 하였다.

- [0084] 각 코호트에서, 초기 2명의 대상은 1일째에 1회의 연구 약물 수용자 및 1회의 플라시보 수용자였다. 3번째부터 5번째 및 6번째부터 8번째 대상들은 7일째 후(서브그룹 사이에 최소 24시간 떨어져)에 투여 받았다. 각각의 대상은 동일한 서브그룹에서 적어도 1시간 떨어져 투여되었다. 필요한 경우, 나머지 대상들에게 투여는, 그 코호트에서 제1 또는 제2 서브그룹을 포함하는 투여-후(post-dose) 기간 동안 발생할지 모르는 임의의 중요한 안전성의 검토가 있을 때까지 지연되었다. 후속 코호트는 전 코호트 후 적어도 3주에 투여되었다.
- [0085] 선별 검사(screening) 기간:
- [0086] 선별 검사 방문(Screening Visit)(Visit 1)은 활성 치료 기간의 시작 전 21일까지 존재했다. 통보된 동의를 체결한 후, 대상들은 적격성을 위한 선별 검사 절차를 수행하였다.
- [0087] 치료 기간:
- [0088] 대상들은 1일째(Visit 2)에 임상 약리학 단위(Clinical Pharmacology Unit)(CPU)로 투여받았고, 랜덤화 치료 기간은 1일째 시작하여 최소 10-시간 야간 공복이 이어졌다. 대상들은 단일 투여로 CD24Fc 또는 플라시보 치료를 위해 무작위로 할당됐다. 대상들은 4일째 아침까지 제한되어 남아있었다.
- [0089] 후속 조치(Follow-up):
- [0090] 모든 대상들은 후속 방문(Visit 3, Visit 4, Visit 5, Visit 6, 및 Visit 7)에 대해 7일째, 14일째, 21일째, 28일째 및 42일째(±1일)에 CPU로 복귀했다. Visit 7은 모든 대상에 대한 최종 방문이 되었다.
- [0091] 치료 지속(duration): 각 대상에 대한 총 연구 지속기간이 63일까지 되었다. 1일째에는 단일-용량 투여가 일어났다.
- [0092] 대상 수:
- [0093] 계획: 40명의 대상
- [0094] 선별 검사: 224명의 대상
- [0095] 랜덤화: 40명의 대상
- [0096] 완료: 39명의 대상
- [0097] 중지: 1명의 대상
- [0098] 포함을 위한 진단 및 주요 기준: 이 연구의 개체군은 18kg/m<sup>2</sup>와 30kg/m<sup>2</sup> 사이의 체질량지수를 포괄적으로 포함하며, 18과 55세 사이의 연령을 포괄적으로 포함하는 건강한 남성 및 여성이었다.
- [0099] 임상 시험용 제품 및 비교기 정보:
- [0100] CD24Fc: 10mg, 30mg, 60mg, 120mg, 또는 240mg의 단일 투여량을 정맥주사 인퓨전으로 투여했다; 제품 번호: 09MM-036. CD24Fc는 인간 CD24의 성숙한 서열 및 인간 면역글로불린 G1(IgGFc)의 단편 결정화 가능한 영역으로 이루어지는 완전 인간화 융합 단백질이다. CD24Fc를 IV 투여를 위한 멸균, 투명, 무색, 보존제-무함유 수용액으로서 공급하였다. CD24Fc는 10mg/mL의 농도 및 pH7.2로, 단일 투여 주사 용액으로서 제형화되었다. 각각의 CD24Fc 바이알(vial)은 160mg의 CD24Fc, 5.3mg의 염화나트륨, 32.6mg의 인산나트륨 2염기성 7수화물, 및 16mL ±0.2mL의 CD24Fc 중 140mg의 인산나트륨 1염기성 1수화물을 함유하고 있다. CD24Fc는 클로로부틸 고무 스톱퍼 및 알루미늄 플립-오프 밀봉을 갖는 투명한 붕규산염 유리 바이알에 공급되었다.
- [0101] 정맥주사 인퓨전을 통해 투여되는 매칭 플라시보(0.9% 염화나트륨, 염류용액); 제품 번호: P296855, P311852, P300715, P315952.
- [0102] 인텐트-투-트리트(intent-to-treat)(ITT) 개체군은 적어도 1회 연구 약물을 투여받은 모든 대상으로 이루어진다. ITT 개체군은 대상 정보 및 안전성 평가를 위한 1차 분석 개체군이다.
- [0103] 임상적 실험실 평가(화학, 혈액학, 및 소변검사)는 치료 및 방문에 의해 요약되었다. 베이스라인으로부터의 변화가 요약되었다. 활력 징후들(혈압, 심박수, 호흡 속도, 및 체온)은 치료 및 시점에 의해 요약했다. 베이스라인으로부터의 변화가 요약되었다. 모든 물리적 검사 데이터를 열거하였다. 심전도 파라미터 및 베이스라인으로부터의 변화가 요약되었다. 전체 해석이 열거되었다. 코호트 1(CD24Fc 10mg 그룹)에 대해 1일째, 7일째, 및 42일째에서 공복 LDL-C 및 고밀도 지질단백질 콜레스테롤을 얻었고, 코호트 2(CD24Fc 30mg 그룹)에 대한

출발에서, 이 지질 샘플링은 14일째를 포함하도록 확장되었다.

[0104] 실시예 4

[0105] 인간에서 CD24 약물동력학

[0106] 이 실시예는 인간에서 CD24 단백질의 약물동력학 분석을 나타낸다.

[0107] 혈장 CD24Fc 농도

[0108] 도 5 에 도시된 바와 같이, CD24Fc의 평균 혈장 농도는 투여되는 CD24Fc의 용량에 비례하여 증가한다. 120mg을 제외한 모든 투여 그룹에 대하여, CD24Fc의 최대 평균 혈장 농도는 1시간 투여 후에 도달하였다. 120mg 그룹에 대한 CD24Fc의 최대 평균 혈장 농도는 2시간 투여 후에 도달하였다. 42일째(984시간)까지, 모든 그룹에 대한 CD24Fc의 평균 혈장 농도는 최대 평균 혈장 농도의 2%와 4% 사이로 감소되었다.

[0109] 표 3은 PK 평가 개체군에 대한 치료에 의한 혈장 CD24Fc PK 파라미터들을 요약한다.

[0110] [표 3] 치료에 의한 혈장 CD24Fc 약물동력학적 파라미터의 요약- PK 평가 가능한 개체군

Parameter Statistic	CD24Fc 10 mg (N=6)	CD24Fc 30 mg (N=6)	CD24Fc 60 mg (N=6)	CD24Fc 120 mg (N=6)	CD24Fc 240 mg (N=6)
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	2495 (576)	9735 (1715)	30 083 (7179)	52 435 (9910)	95 865 (10 734)
CV%	23.1	17.6	23.9	18.9	11.2
Median	2371	9218	29 026	50 401	93 206
Min, Max	1,967, 3,390	8,583, 13,086	22,557, 42,628	40,434, 65,704	81,296, 110,110
Geometric mean	2,442	9,625	29,424	51,666	95,365
Geometric CV%	22.8	16.1	23.0	19.0	11.2
<b>AUC<sub>0-42d</sub> (ng*hr/mL)</b>					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	423,061 (99,615)	1,282,430 (88,798)	3,226,255 (702,862)	6,541,501 (2,190,944)	12,704,705 (1,918,596)
CV%	23.5	6.9	21.8	33.5	15.1
Median	434,043	1,302,719	3,124,933	5,785,142	12,563,426
Min, Max	291,020, 528,079	1,175,733, 1,403,024	2,487,550, 4,139,748	4,485,193, 9,415,266	10,466,635, 15,693,606
Geometric mean	412,795	1,279,851	3,163,252	6,249,552	12,586,731
Geometric CV%	25.0	7.0	22.0	33.8	15.0
<b>AUC<sub>0-inf</sub> (ng*hr/mL)</b>					
n	6	6	6	6	6

[0111]

Parameter Statistic	CD24Fc 10 mg (N=6)	CD24Fc 30 mg (N=6)	CD24Fc 60 mg (N=6)	CD24Fc 120 mg (N=6)	CD24Fc 240 mg (N=6)
Mean (SD)	462,260 (116,040)	1,434,464 (131,316)	3,497,196 (705,653)	7,198,196 (2,458,320)	13,861,796 (1,962,780)
CV%	25.1	9.2	20.2	34.2	14.2
Median	470,426	1,422,205	3,519,732	6,463,665	13,713,034
Min, Max	310,956, 596,599	1,281,715, 1,650,503	2,703,655, 4,309,023	4,910,640, 10,479,940	11,822,988, 17,175,236
Geometric mean	449,583	1,429,578	3,437,036	6,862,129	13,750,972
Geometric CV%	26.7	9.0	20.7	34.6	13.8
T <sub>max</sub> (hr)					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	1.15 (0.42)	1.17 (0.41)	1.01 (0.01)	1.34 (0.51)	1.33 (0.52)
CV%	36.1	35.0	1.2	38.0	38.7
Median	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00
Min, Max	0.92, 2.00	1.00, 2.00	1.00, 1.03	1.00, 2.00	1.00, 2.00
t <sub>1/2</sub> (hr)					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	280.83 (22.37)	327.10 (41.32)	279.82 (65.59)	286.45 (23.38)	285.33 (24.33)
CV%	8.0	12.6	23.4	8.2	8.5
Median	279.61	317.23	264.69	290.76	287.74
Min, Max	258.87, 321.26	289.82, 394.24	210.18, 362.46	243.89, 309.26	249.24, 322.26
AUC <sub>extr</sub> (%)					
n	6	6	6	6	6

[0112]

Parameter Statistic	CD24Fc 10 mg (N=6)	CD24Fc 30 mg (N=6)	CD24Fc 60 mg (N=6)	CD24Fc 120 mg (N=6)	CD24Fc 240 mg (N=6)
Mean (SD)	7.61 (2.14)	10.44 (2.94)	7.88 (4.26)	8.92 (1.94)	8.46 (1.99)
CV%	28.1	28.2	54.0	21.8	23.5
Median	7.16	10.01	6.35	9.27	8.45
Min, Max	5.46, 11.47	7.10, 15.05	3.92, 14.48	5.49, 10.99	5.56, 11.50
CL (L/hr)					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	0.0229 (0.0061)	0.0211 (0.0019)	0.0178 (0.0036)	0.0183 (0.0058)	0.0176 (0.0023)
CV%	26.7	8.8	20.5	31.7	13.3
Median	0.0216	0.0211	0.0173	0.0191	0.0175
Min, Max	0.0168, 0.0322	0.0182, 0.0234	0.0139, 0.0222	0.0115, 0.0244	0.0140, 0.0203
V <sub>d</sub> (L)					
n	6	6	6	6	6
Mean (SD)	9.153 (1.943)	9.867 (0.804)	7.289 (2.592)	7.491 (2.202)	7.276 (1.426)
CV%	21.2	8.1	35.6	29.4	19.6
Median	8.507	10.007	7.486	7.691	7.151
Min, Max	7.326, 12.010	8.771, 10.958	4.222, 11.139	4.933, 9.974	5.814, 9.438
AUC <sub>0-42d</sub> = area under the concentration-time curve from time 0 to 42 days; AUC <sub>0-inf</sub> = area under the concentration-time curve extrapolated from time 0 to infinity; AUC <sub>extr</sub> = percentage of AUC <sub>0-inf</sub> that was due to extrapolation from the time of the last measurable concentration, per subject, to infinity; CL = total body clearance; C <sub>max</sub> = maximum observed plasma drug concentration; CV% = coefficient of variation; Min = minimum; Max = maximum; SD = standard deviation; t <sub>1/2</sub> = terminal elimination half-life; T <sub>max</sub> = time of maximum observed plasma drug concentration; V <sub>d</sub> = volume of distribution.					

[0113]

[0114] 혈장 CD24Fc 용량 비례 분석

[0115] 도 6은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc C<sub>max</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 도 7은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc AUC<sub>0-42d</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 도 8은 PK 평가 가능한 개체군에 대한 CD24Fc AUC<sub>0-inf</sub> 대 용량의 용량 비례 플롯을 나타낸다. 표 4는 용량 비례의 파워 분석을 나타낸다.

[0116] [표 4] 용량 비례의 파워 분석: 혈장 CD24Fc 약물동력학적 파라미터-PK 평가 가능한 개체군

Parameter Statistic	CD24Fc 10 mg (N=6)	CD24Fc 30 mg (N=6)	CD24Fc 60 mg (N=6)	CD24Fc 120 mg (N=6)	CD24Fc 240 mg (N=6)	Dose Proportionality		
						Slope Estimate	Standard Error	90% CI
C <sub>max</sub> (ng/mL)						1.172	0.040	(1.105, 1.240)
Geometric mean	2,441.8	9,624.9	29,424.4	51,666.4	95,364.9			
Geometric CV%	22.8	16.1	23.0	19.0	11.2			
AUC <sub>0-42d</sub> (ng*hr/mL)						1.088	0.036	(1.027, 1.148)
Geometric mean	412,794.8	1,279,850.8	3,163,251.7	6,249,551.9	12,586,731.3			
Geometric CV%	25.0	7.0	22.0	33.8	15.0			
AUC <sub>0-inf</sub> (ng*hr/mL)						1.087	0.036	(1.026, 1.148)
Geometric mean	449,583.5	1,429,577.5	3,437,035.6	6,862,128.7	13,750,972.4			
Geometric CV%	26.7	9.0	20.7	34.6	13.8			

Geometric CV% = 100\*sqrt(exp(SD<sup>2</sup>)-1), where SD was the standard deviation of the log-transformed data. The power model was fitted by restricted maximum likelihood, regressing the log-transformed PK parameter on log transformed dose. Both the intercept and slope were fitted as fixed effects. Dose proportionality was not rejected if the 90% CI lies within (0.8, 1.25).  
 AUC<sub>0-42d</sub> = area under the concentration-time curve from time 0 to 42 days; AUC<sub>0-inf</sub> = area under the concentration-time curve extrapolated from time 0 to infinity; CI = confidence interval; C<sub>max</sub> = maximum observed plasma drug concentration; CV% = coefficient of variation; PK = pharmacokinetic; SD = standard deviation.

[0117]

[0118] C<sub>max</sub> 기울기 추정치는 1.105 내지 1.240의 90% CI에 대해 1.172이었다. AUC<sub>0-42d</sub> 기울기 추정치는 1.027 내지 1.148의 90% CI에 대해 1.088이었다. AUC<sub>0-inf</sub> 기울기 추정치는 1.026 내지 1.1의 90% CI에 대해 1.087이었다.

[0119] 약물동력학적 결론

[0120] 혈장 CD24Fc의 C<sub>max</sub> 및 AUCs는 마우스, 원숭이 및 인간에게 투여된 용량에 비례하여 증가한다. 혈장 CD24Fc는 1.01과 1.34시간 사이의 T<sub>max</sub>에 도달하였다. 혈장 CD24Fc의 t<sub>1/2</sub>은 280.83과 327.10 시간사이의 범위를 갖는다.

도면

도면1a

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**  
**NPTNATTK**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF  
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면1b

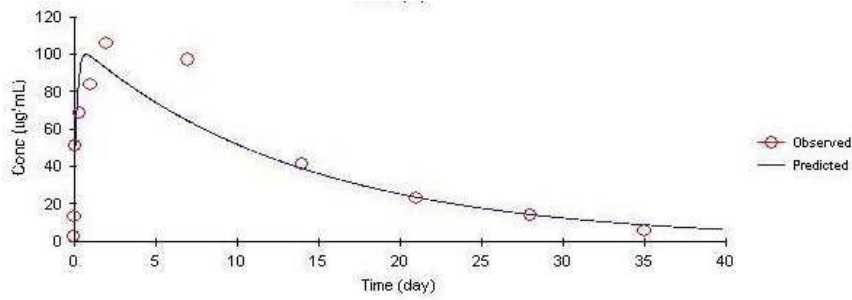
MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**  
**NPTNATTKV**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면1c

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYS**SETTTGTSSNSSQSTSNSGLAP**  
**NPTNATTKA**PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK



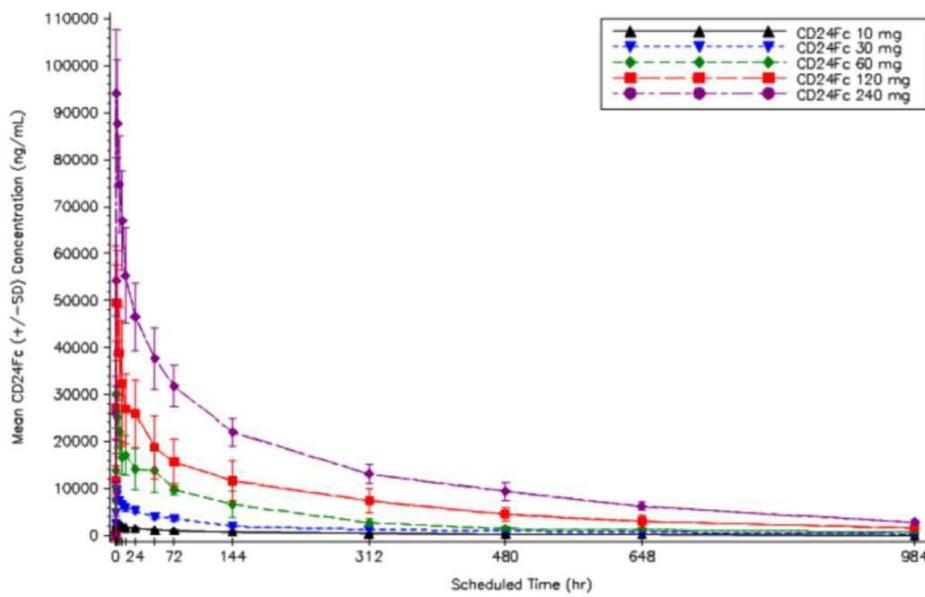
도면4b



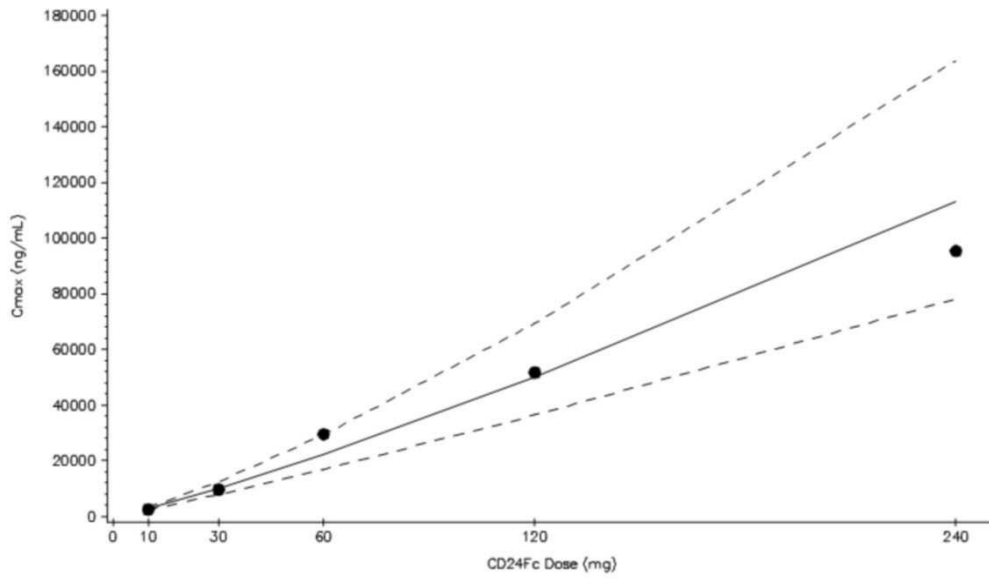
도면4c

Routes	Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
i.v.	AUC	day*ug/mL	1709.5	305.2	17.85
s.c.			1453.2	181.4	12.49
i.v.	K10_HL	day	9.52	1.96	20.56
s.c.			9.54	1.43	14.97
i.v.	Cmax	ug/mL	124.4	10.3	8.31
s.c.			99.6	11.1	11.11

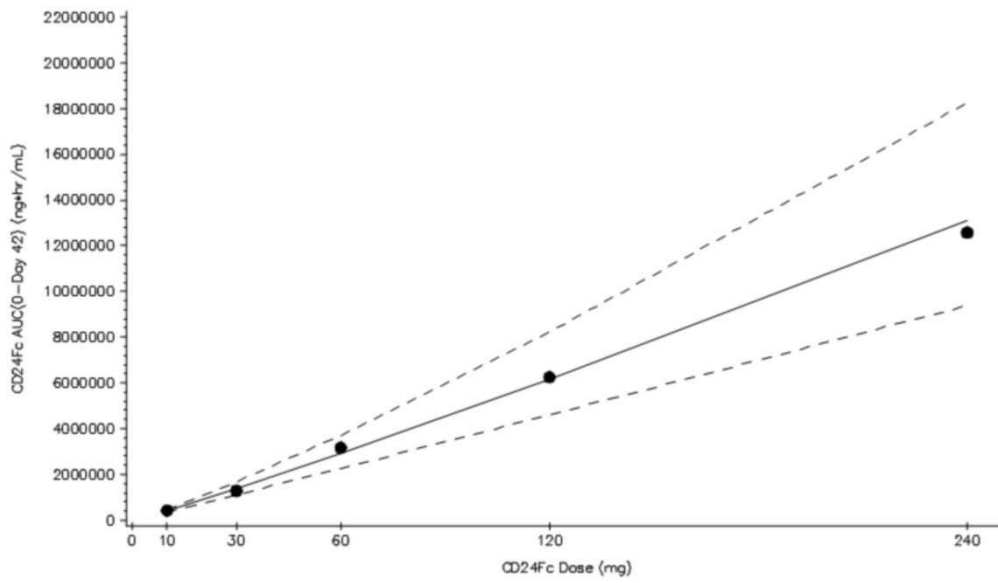
도면5



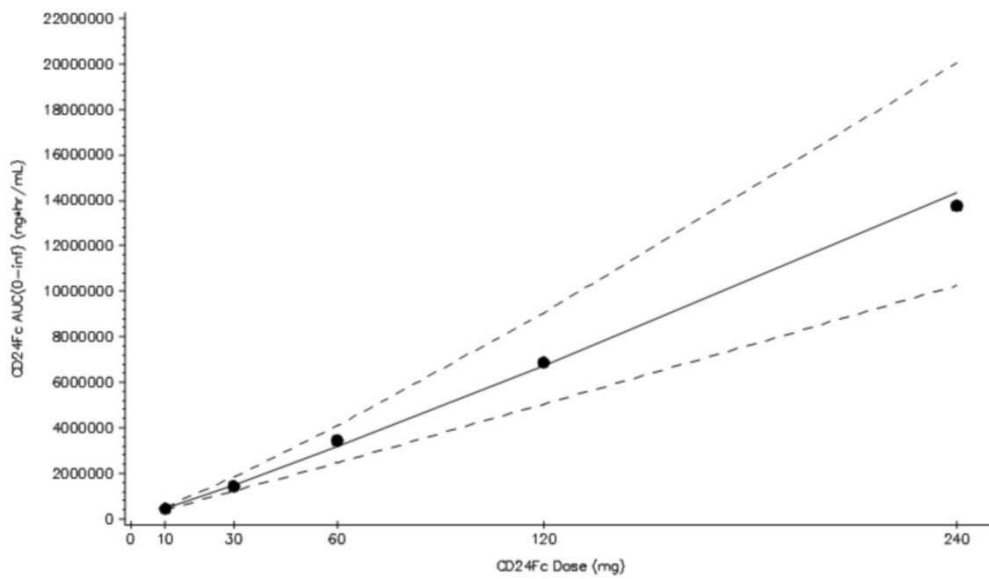
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OncoImmune, Inc.

Liu, Yang

Zheng, Pan

<120> USE OF CD24 FOR LOWERING LOW-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL LEVELS

<130> 060275.0500.01PC00

<150> 62158157

<151> 2015-05-07

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> X

<222> (31)..(31)

<223> Valine or Alanine

<400> 1

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1                    5                    10                    15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Xaa

                  20                    25                    30

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1                    5                    10                    15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys

                  20                    25                    30

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asn Gln Thr Ser Val Ala Pro Phe Pro Gly Asn Gln Asn Ile Ser Ala

1                    5                    10                    15

Ser Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Arg Gly

                  20                    25

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Ala Leu Leu Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Ser

                  20                    25

<210> 5

<211> 287

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Fusion protein

<400> 5

Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Leu Leu Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Ser Ser Glu Thr Thr Thr Gly  
                   20                    25                    30  
 Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser Asn Ser Gly Leu Ala Pro  
                   35                    40                    45  
 Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
                   50                    55                    60  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                   85                    90                    95  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
                   100                    105                    110  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
                   115                    120                    125  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
                   130                    135                    140  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
                   165                    170                    175  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
                   180                    185                    190  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
                   195                    200                    205  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
                   210                    215                    220

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

                         245                      250                      255  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
                          260                      265                      270  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                          275                      280                      285

<210> 6

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Fusion protein

<400> 6

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser  
 1                      5                      10                      15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Pro Lys  
                          20                      25                      30

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
                          35                      40                      45

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
                          50                      55                      60

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 65                      70                      75                      80

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
                          85                      90                      95

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
                          100                      105                      110

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
                          115                      120                      125

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

130 135 140

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 165 170 175  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 180 185 190  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 195 200 205

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 210 215 220  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 225 230 235 240  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 245 250 255  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 260

<210> 7  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 20 25 30  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 35 40 45  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr





<210> 9

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Fusion protein

<400> 9

Met Gly Arg Ala Met Val Ala Arg Leu Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Ala Leu Leu Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Ser Ser Glu Thr Thr Thr Gly

                  20                    25                    30

Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser Asn Ser Gly Leu Ala Pro

                  35                    40                    45

Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

50                    55                    60

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

65                    70                    75                    80

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

                  85                    90                    95

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

                  100                    105                    110

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

115                    120                    125

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

130                    135                    140

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

145                    150                    155                    160

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

                  165                    170                    175

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

180                    185                    190

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

195                    200                    205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 210 215 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

225 230 235 240

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 245 250 255

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 260 265 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 275 280 285

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 10

Thr Val Thr Thr Ser Ala Pro Leu Ser Ser Asn Ser Pro Gln Asn Thr  
 1 5 10 15

Ser Thr Thr Pro Asn Pro Ala Asn Thr Thr Thr Lys Ala  
 20 25

<210> 11

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Fusion protein

<400> 11

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser  
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Val Pro  
 20 25 30

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 35 40 45

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp



<400> 12

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Pro

20 25 30

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

35 40 45

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

50 55 60

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

65 70 75 80

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

85 90 95

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

100 105 110

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

115 120 125

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

130 135 140

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

145 150 155 160

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

165 170 175

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

180 185 190

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

195 200 205

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

210 215 220

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

225 230 235 240

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

245

250

255

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

260